

(11)Publication number : 2000-093188

(54) FERMENTATION FOR PRODUCTION OF XYLITOL USING CANDIDA TROPICALIS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce xylitol in high productivity and yield by fermenting new *Candida tropicalis* strain at respectively specific pH, temperature and dissolved oxygen concentration in a medium having a specific composition to give maximum productivity of xylitol.

SOLUTION: Xylitol is produced at maximized productivity by using a new *Candida tropicalis* strain deposited under KCCM-10122 at the Korean Microorganism Culture Center as the fermentation microorganism, fermenting a xylose culture medium having a composition to give maximum productivity of xylitol, i.e., 5-20 w/v% xylose, 0.2-1.0 w/v% glucose, 0.2-2.0 w/v% yeast extract, 0.2-2.0 w/v% ammonium sulfate, 0.2-2.0 w/v%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.01-0.2 w/v%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  at pH 4.5-5.5 and 27-33°C at a air saturation ratio of 0.1-5.0% in terms of dissolved oxygen concentration in the medium while controlling the reduction- oxidation potential in the culture base to -50 to -150 mV, removing cells and other residues from the fermentation product and recovering the objective product from the culture base.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-93188

(P2000-93188A)

(43) 公開日 平成12年4月4日 (2000. 4. 4)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/18		C 1 2 P 7/18	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/16		C 1 2 N 1/16	G 4 B 0 6 5
// (C 1 2 P 7/18			
C 1 2 R 1:74)			
(C 1 2 N 1/16			

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-266033

(22) 出願日 平成10年9月21日 (1998. 9. 21)

(71) 出願人 598128535

ボラック・カンパニー・リミテッド  
大韓民国 キュンギード、ファスンーク  
ン、ヤンガム-ミョン、ソンサン-リ  
307-1

(72) 発明者 サン・ヨン・キム  
大韓民国 キュンギード、カンミュー  
シ、チュルサン-2-ドン、ジョーゴン・  
アパートメント 903-407

(74) 代理人 100090609  
弁理士 大島 正孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カンジダトロピカリスを用いたキシリトール製造のための発酵法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 発酵法によるキシリトールの新規な生産方法の提供。

【解決手段】 カンジダトロピカリス (Candida tropicalis) の新規な菌株を用いて、高い生産性および高い収量でキシリトールを製造するための発酵法。さらに詳しくは、キシロースを含有する培地の組成をおよび pH、温度および DO 濃度の如き環境条件を最適化することによって最大量のキシリトールを生産するために最適な発酵条件下においてキシリトールを製造するための発酵法に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 i) 以下の発酵条件；

a) キシリトールの最大生産量を得るための培養基の組成が 5~20 (w/v) % のキシロース、0.2~1.0 (w/v) % のグルコース、0.2~2.0 (w/v) % のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) % の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2~2.0 (w/v) % の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  および 0.01~0.2 (w/v) % の  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  で構成される；

b) 培養基の pH は 4.5~5.5 である；

c) 培養温度は 27~33℃ である。

d) 該培養基中の溶解酸素濃度は 0.1~5.0 (w/v) % の空気飽和率であり；そして

e) 該培養基中のレドックス（還元-酸化）電位は -50~-150 mV である、を制御することによってキシロース培養基を細胞で発酵させ；

i) 細胞および他の残留物を該発酵培養基から除去し；そして

ii) 上記工程 i) の該発酵培養基からキシリトールを単離し回収する；工程からなる、受託番号 KCCM-10122 を持つ韓国微生物カカルチャーセンターに寄託されたカンジダトロピカリスの新規な菌株を用いる、キシリトールの生産量を最大限にするための発酵法。

【請求項 2】 発酵に用いられる細胞が凍結カンジダトロピカリス (KCCM-10122) を、0.8~1.2 (w/v) % のグルコース、0.4~0.6 (w/v) % のペプトン、0.3~0.5 (w/v) % のイースト抽出物、および 0.2~0.4 (w/v) % の麦芽抽出物を含む YM 培養基中で 27~33℃ の温度で 6~18 時間培養することによって調整される、請求項 1 の発酵法。

【請求項 3】 キシリトールの産生段階中にキシロースとグルコースが下記方法；

i) 液体培地に断続的にキシロースを供給し；および/または

ii) 断続的に、キシロースとグルコース 20:1~5:1 (w/w) の混合物を供給する；

で培養基へと供給される、請求項 1 の発酵法。

【請求項 4】 カンジダトロピカリス (KCCM-10122) の新規な細胞。

【請求項 5】 i) 野生型カンジダトロピカリス (KCCM-10122) を酵母-麦芽 (YM) 培養基上に塗布し、培養し；

ii) 発生したコロニーを少なくとも 10 回 YM 培養基上に単離し；そして

iii) 急速に生育するコロニーを単離する；

工程からなる、カンジダトロピカリス (KCCM-10122) を単離する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明はカンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) の新規な菌株を用いて、高い生産性および高い収量でキシリトールを製造するための発酵法、さらに詳しくは、キシロースを含む培養基の組成を並びに pH、温度および DO 濃度の如き環境条件を最適化することによって最大量のキシリトールを生産するために最適発酵条件下においてキシリトールを製造するための発酵法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 キシリトール (キシロペンタン-1, 2, 3, 4, 5 ペントール) は、様々な果物、野菜、およびキノコ類中に少量で存在する、自然発生の 5 炭素糖アルコールである。これはジュート (黄麻) の枝やバナナの残渣の如き植物体をシュウ酸で処理することによって製造できる。しかしながら、サトウキビやサトウダイコンの茎と比較して、天然資源に存在する少量のみでは、その定量的抽出は困難かつ不経済となる。さらにキシリトールは、哺乳動物の炭水化物代謝作用の標準的な代謝中間物でもある。キシリトールには数多くの有利な自然の特性がある。キシリトールは酸の形成を阻む抗発熱性を有し、さらに口腔内の衛生を促進し予防を図ることができる。キシリトールは、その代謝作用を調節するためインシュリンを必要としないため、砂糖の代用品として糖尿病の治療に用いることもできる。その代謝作用はグルコース-6-フوسفエートデヒドロゲナーゼを伴わないため、キシリトールはグルコース-6-フوسفエートデヒドロゲナーゼの不足している人にとっては理想的な甘味料でもある。

【0003】 工業的規模では、キシリトールはカバ材もしくはキシロースの豊富な材質のヘミセルロース加水分解物に由来するキシロースの化学還元によって製造される。これらの原料のヘミセルロースフラクションは他の糖の重合体を含有するため、この処理工程にはキシロースまたはキシリトールからの副産物を除去するための大規模な精製および単離工程が包含される。キシリトールの収量は約 50~60 % である。それ故に、キシリトールは高価な生産品である。化学的な方法によるキシリトールの生産は、その単離および精製工程の難しさのために高価であることがわかっていて、微生物を用いてキシリトールを効果的に生産するための別の方法を探索することは価値のあることである。

【0004】 化学的製造法の上記欠点を克服すべく、キシリトール製造用に生物学的発酵法が研究されてきた。キシロース或いはキシロースを有するヘミセルロース加水分解物を含有する培養基からの酵母種を用いてキシリトールを製造する発酵法が開示されている。特に、カンジダブランキ (*Candida blankii*)、カンジダグリエルモンディ (*Candida guil*

liermundii)、カンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンジダウティリス (*Candida utilis*)、サッカロマイセスバイルイ (*Saccharomyces bailii*)、サッカロマイセスロウクシ (*Saccharomyces rouxii*)、サッカロマイセスウヴァリウム (*Saccharomyces uvarium*)、およびサッカロマイセスポンベ (*Saccharomyces pombe*) がキシリトールを産生する微生物として知られている。しかしながら、キシリトールの生産は、その産生速度が遅いため、それ程望ましいものではない。

【0005】キシリトールの収量と生産性を改善すべく、本発明における高キシリトール生産性酵母がキシロース製造工場のスラッジから単離され、カンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) として同定された。発酵条件は、最大量のキシリトールを生産するためにこの菌株を用いて最適化される。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高い生産性および高い収量でキシリトールを製造するために、ブダペスト条約下において1998年2月20日に受託番号 KCCM-10122 を持つ韓国微生物カルチャーセンター (Korean Culture Center) に寄託されたカンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) の新規な菌株を提供することである。

#### 【0007】本発明の他の目的は、

- i) 以下の発酵条件；
  - a) キシリトールの最大生産量を得るための培養基の組成が5~20 (w/v) %のキシロース、0.2~1.0 (w/v) %のグルコース、0.2~2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) %の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2~2.0 (w/v) %のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> および0.01~0.2 (w/v) %のMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで構成される；
  - b) 培養基のpHは4.5~5.5である；
  - c) 培養温度は27~33℃である；
  - d) 該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0 (w/v) %の空気飽和率であり；そして
  - e) 該培養基中のレドックス (還元-酸化) 電位は-50~-150mVである、
- を制御することによってキシロース培養基を細孔で培養し；
- i i) 細胞および他の残留物を該発酵培養基から除去し；
- i i i) 上記工程 i i) の該発酵培養基からキシリトールを単離し回収する；工程からなる、受託番号 KCCM-10122 を持つ韓国微生物カルチャーセンター (Korean Culture Center) に寄託

されたカンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) の新規な菌株を用いる、キシリトールの生産量を最大限にするのに最適な発酵法を提供することにある。

【0008】本発明のさらに他の目的は、キシリトールの生産段階中にキシロースとグルコースが下記方法；

i) 液体培地に断続的にキシロースを供給し；および/または

i i) 連続的に、キシロースとグルコース20:1~5:1 (w/w) の混合物を供給する；

で培養基へと供給される発酵法を提供することである。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明はキシロース製造工場 (コーリアバイオテック社 [Korea Bio Tech Co.], アンヤン市 [Anyang], 韓国 [Korea]) のスラッジから単離されたカンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) 中でキシリトールを高収量および高容積生産性で得るための方法に関する。本発明に使用される細胞は以下の方法によって単離される。

【0010】キシロースを製造する際のスラッジの液体培地を、0.8~1.2%のグルコース、0.4~0.6%のペプトン、0.3~0.5%のイースト抽出物および0.2~0.4%の麦芽抽出物および1.2~1.8%の寒天を含有する酵母-麦芽 (YM) 板上に塗り、28~32℃の温度で培養する。コロニーの幾つかを急速生菌株として選択する。選択されたコロニーを、5~15%のキシロース、0.2~0.8%のイースト抽出物、0.2~0.8%の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> および0.2~0.8%のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を含有する発酵培養基に移し、振盪フラスコ中でキシリトールの生産活性を試験する。28~32℃の温度および200~240 rpmの回転速度で24~36時間培養した後、高キシリトール生産性菌株を選択する。キシロースを製造する際のスラッジから単離される多くの菌株が上記の選択方法を10回以上繰り返すことによって得られる。最後に、キシリトール生産性の最も高いコロニーを単離し、そして本発明におけるキシリトール生産用菌株として使用する。

【0011】形態学的、培養的、および生理学的特性的の考察が、クレガー-ヴァンリッジ法 [Kreger-Van Rij method] (酵母：分類学的研究 エルヴィエルサイエンスパブリッシャー、アムステルダム、1984) [The yeasts: a taxonomic study Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1984] に基づいて実施され、上記単離された菌株は、バーネット法 [Barnett method] (酵母：特性と同定。ケンブリッジ大学新聞、ロンドン、1983) [Yeasts: Characteristic and Identification, Cambr

idge University Press, London, 1983]に基づいて同定される。該単離され\*

\* 該菌株の生理学的特徴は以下の通りである。

【0012】

i) 生育温度	20℃	+	30℃	+	37℃	+	42℃	-
ii) 生育	30%のD-グルコースで	+	40%のD-グルコースで	+				
iii) 尿素加水分解					-			
iv) 澱粉生成					-			
v) ジアゾニウムブルーBの生成反応					-			
vi) 硝酸塩の同化					-			
vii) アルバチンの放出					-			
viii) 糸状体					+			
ix) 炭素源の同化								
グルコース	+	ガラクトース	+	レーソルボース	-	スクロース	+	
マルトース	+	ラクトース	+	トレハロース	+	セロビオース	-	
メリビオース	-	ラフィノース	+	メレシトース	-	可溶性デンプン	+	
D-キシロース	+	L-アラビノース	+	D-アラビノース	-	D-リボース	-	
D-ラムノース	-	グリセロール	+	エリトリール	-	リビトリール	+	
ガラクトチール	-	D-マニトール	+	D-ソルビトリール	+	D-グルシトリール	-	
キシリトリール	-	イノシトリール	-	サリシン	-	イヌリン	-	
D-L-乳酸	-	コハク酸	+	クエン酸	+	鏡酸	-	
エタノール	+	メタノール	-					

【0013】これらの結果から、単離された菌株はカンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) と同定される。これらの細胞は、受託番号 KCCM-10122 で韓国微生物カルチャー (Korean Culture) に寄託されている。以下は上記の如き細胞を用いてキシリトリールを生産する発酵法についての記述である。

【0014】シード培養

カンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) (KCCM-10122) の凍結 (-70℃) 細胞を、28~32℃の温度および220~260 rpmの回転速度で8~16時間、40~60mlのY M培養基 (0.8~1.2 (w/v) %のグルコース、0.4~0.6 (w/v) %のペプトン、0.3~0.5 (w/v) %のイースト抽出物および0.2~0.4 (w/v) %の麦芽抽出物) を含有する250mlのフラスコ中で培養した。次いでこのシード培養を主培養中でキシリトリールを生産するための5Lの発酵器へと移す。

【0015】主培養

該発酵培養基は、5~20 (w/v) %のキシロース、0.2~2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) %のグルコース、0.2~2.0 (w/v) %の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2~2.0 (w/v) %のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、および0.01~0.2 (w/v) %のMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで構成される。発酵培養基を含有する発酵器中でフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600 rpmである。キシリトリール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス (還元-酸

化) 電位は-50~-150mV、好ましくは-80~-120mVである。フェドバッチ培養は2Lの初期培養基を用いて実施され、そして最終容量はキシロースとグルコースの混合溶液を1.0L供給することによって3Lとする。

【0016】該発酵処理は好ましくはフェドバッチ法によって実施される。キシロースが該培養基中で完全に消費された後に、キシリトリール、グルコースおよびキシリトリールの量をシュガーバックイカラム (Sugar Pak I column) を備えた高性能液体クロマトグラフィーを用いて測定する。乾燥細胞の重量は、600nmにおける光学濃度と乾燥細胞の重量との関係から得られる検量線を用いて見積もられる。

【0017】測定されたキシリトリールの収量はキシロース消費量の生物量の85~98%であり、そして容積生産性は3.0~7.0 g/L-hrであり、両者は従来の発酵収量および生産性と比較して5倍から15倍に増加している。最後に、該発酵培養基を遠心分離して細胞および他の残留物を除去し、そして上澄み液をろ過および透析してキシリトリールを得る。本発明は以下の実施例によってさらに詳しく説明することができるが、本発明の範囲はそれらに限定されない。

【0018】

【実施例】実施例1

カンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) (KCCM-10122) の凍結 (-70℃) 細胞を、28~32℃の温度および220~260 rpmの回転速度で8~16時間、40~60mlのY M培養基 (0.8~1.2 (w/v) %のグルコース、0.4~0.6 (w/v) %のペプトン、0.3~0.5

(w/v) %のイースト抽出物および0.2~0.4 (w/v) %の麦芽抽出物を含有する250mlのプラスチック中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシリトールを生産するための発酵培養基を含有する5Lの発酵器へと移す。該初期発酵培養基は、5~15 (w/v) %のキシロース、0.2~1.5 (w/v) %のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) %の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2~2.0 (w/v) %の $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.01~0.2 (w/v) %の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で構成される。該発酵器中のフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600rpmである。キシリトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス(還元-酸化)電位は-50~-150mV、好ましくは-80~-120mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。キシロースのフェドバッチ培養はキシリトールの生産における高キシロース濃度の抑制作用のため実施される。発酵器の容量は、150gのキシロースを含有する250mlを4回供給することによって(20、27、34、41時間)、200gのキシロースを含有する2Lから900gのキシロースを含有する3Lへと増量する。

【0019】48時間発酵させた後、キシリトールの量をシュガーバック1カラム(Sugar-Pak 1 column)を備えたHPLCによって測定する。300g/Lのキシロースから240g/Lのキシリトールが得られ、これはキシロースからのキシリトールの収量の80%に相当する。断続的なフェドバッチ培養のキシリトール生産速度は5.00g/L-hrである。

#### 【0020】実施例II

カンジダトロピカリス(Candida tropicalis) (KCCM-10122)の凍結(-70℃)細胞を、28~32℃の温度および220~260rpmの回転速度で8~16時間、40~60mlのYM培養基(0.8~1.2 (w/v) %のグルコース、0.4~0.6 (w/v) %のペプトン、0.3~0.5 (w/v) %のイースト抽出物および0.2~0.4 (w/v) %の麦芽抽出物)を含有する250mlのプラスチック中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシリトールを生産するための発酵培養基を含有する5Lの発酵器へと移す。該発酵培養基は、5~15 (w/v) %のキシロース、0.2~1.5 (w/v) %のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) %の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2~2.0 (w/v) %の $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.01~0.2 (w/v) %の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で構成される。該発酵器中のフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600rpmである。キシリトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率

率であり、そして該培養基中のレドックス(還元-酸化)電位は-50~-150mV、好ましくは-80~-120mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。キシロースのフェドバッチ培養はキシリトールの生産における高キシロース濃度の抑制作用のため実施される。発酵器の容量を900gのキシロースを含有する2Lから、700gのキシロースを含有する1Lの溶液を連続して供給することによって増量する。キシロースの供給は3.0~6.0%の残留キシロース率において開始される。

【0021】48時間発酵させた後、キシリトールの量をシュガーバック1カラム(Sugar-Pak 1 column)を備えたHPLCによって測定する。300g/Lのキシロースから255g/Lのキシリトールが得られ、これはキシロースからのキシリトールの収量の85%に相当する。断続的なフェドバッチ培養のキシリトール生産速度は5.31g/L-hrである。

#### 【0022】実施例III

カンジダトロピカリス(Candida tropicalis) (KCCM-10122)の凍結(-70℃)細胞を、28~32℃の温度および220~260rpmの回転速度で8~16時間、40~60mlのYM培養基(0.8~1.2 (w/v) %のグルコース、0.4~0.6 (w/v) %のペプトン、0.3~0.5 (w/v) %のイースト抽出物および0.2~0.4 (w/v) %の麦芽抽出物)を含有する250mlのプラスチック中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシリトールを生産するための発酵培養基を含有する5Lの発酵器へと移す。該発酵培養基は、5~15 (w/v) %のキシロース、0.5~2.0 (w/v) %のグルコース、0.2~2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) %の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2~2.0 (w/v) %の $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.01~0.2 (w/v) %の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で構成される。該発酵器中のフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600rpmである。キシリトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス(還元-酸化)電位は-50~-150mV、好ましくは-80~-120mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。キシロースのフェドバッチ培養はキシリトールの生産における高キシロース濃度の抑制作用のため実施される。発酵器の容量を900gのキシロースを含有する2Lから、700gのキシロースおよび35gのグルコースを含有する1Lの溶液を連続して供給することによって増量する。キシロースの供給は3.0~6.0%の残留キシロース率において開始される。

【0023】48時間発酵させた後、キシリトールの量をシュガーバック1カラム(Sugar-Pak 1

column)を備えたHPLCによって測定する。300g/Lのキシロースから270g/Lのキシトールが得られ、これはキシロースからのキシトールの収量の90%に相当する。キシロースとグルコースの連続的なフェドバッチ培養のキシトール生産速度は5.63g/L-hrである。

#### 【0024】実施例IV

カンジダトロピカリス(Candida tropicalis)(KCCM-10122)の凍結(-70℃)細胞を、28~32℃の温度および220~260rpmの回転速度で8~16時間、40~60mlのYM培養基(0.8~1.2(w/v)%のグルコース、0.4~0.6(w/v)%のペプトン、0.3~0.5(w/v)%のイースト抽出物および0.2~0.4(w/v)%の麦芽抽出物)を含有する250mlのフラスコ中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシトールを生産するための発酵培養基を含有する5Lの発酵器へと移す。該発酵培養基は、5~15(w/v)%のキシロース、0.5~2.0(w/v)%のグルコース、0.2~2.0(w/v)%のイースト抽出物、0.2~2.0(w/v)%の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2~2.0(w/v)%のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01~0.2(w/v)%のMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで構成される。該発酵器中でのフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600rpmである。キシトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス(還元-酸化)電位は-50~-150mV、好ましくは-80~-120mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。キシロースのフェドバッチ培養はキシトールの生産における高キシロース濃度の抑制作用のため実施される。発酵器の容量を900gのキシロースを含有する2Lから、700gのキシロースおよび100gのグルコースを含有する1Lの溶液を連続して供給することによって増量する。キシロースの供給は3.0~6.0%の残留キシロース率において開始される。

【0025】48時間発酵させた後、キシトールの量をシュガーバック1カラム(Sugar-Pak I column)を備えたHPLCによって測定する。300g/Lのキシロースから290g/Lのキシトールが得られ、これはキシロースからのキシトールの収

\*量の97%に相当する。キシロースとグルコースの連続的なフェドバッチ培養のキシトール生産速度は6.04g/L-hrである。

#### 【0026】実施例V

カンジダトロピカリス(Candida tropicalis)(KCCM-10122)の凍結(-70℃)細胞を、28~32℃の温度および220~260rpmの回転速度で8~16時間、40~60mlのYM培養基(0.8~1.2(w/v)%のグルコース、0.4~0.6(w/v)%のペプトン、0.3~0.5(w/v)%のイースト抽出物および0.2~0.4(w/v)%の麦芽抽出物)を含有する250mlのフラスコ中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシトールを生産するための発酵培養基を含有する5Lの発酵器へと移す。該初期発酵培養基は、5~15(w/v)%のキシロース、0.5~2.0(w/v)%のグルコース、0.2~1.5(w/v)%のイースト抽出物、0.2~2.0(w/v)%の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2~2.0(w/v)%のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01~0.2(w/v)%のMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで構成される。該発酵器中でのフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600rpmである。キシトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス(還元-酸化)電位は-50~-150mV、好ましくは-80~-120mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。キシロースのフェドバッチ培養はキシトールの生産における高キシロース濃度の抑制作用のため実施される。発酵器の容量を900gのキシロースを含有する2Lから、700gのキシロースおよび140gのグルコースを含有する1Lの溶液を連続して供給することによって増量する。キシロースの供給は3.0~6.0%の残留キシロース率において開始される。

【0027】48時間発酵させた後、キシトールの量をシュガーバック1カラム(Sugar-Pak I column)を備えたHPLCによって測定する。300g/Lのキシロースから280g/Lのキシトールが得られ、これはキシロースからのキシトールの収量の93%に相当する。キシロースとグルコースの連続的なフェドバッチ培養のキシトール生産速度は5.83g/L-hrである。

#### 【手続補正書】

【提出日】平成11年10月18日(1999. 10. 18)

#### 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

#### 【補正方法】変更

#### 【補正内容】

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 i) 細胞をYM培養基中28~32℃で8~16時間生育および培養せしめ、ここでYM培養基

は0.8～1.2 (w/v) %のグルコース、0.4～0.6 (w/v) %のペプトン、0.3～0.5 (w/v) %のイースト抽出物、および0.2～0.4 (w/v) %の麦芽抽出物を含有し；

1 i) 以下の発酵条件；

a) キシリトールの最大生産量を得るための培養基の組成が5～20 (w/v) %のキシロース、0.2～1.0 (w/v) %のグルコース、0.2～2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.2～2.0 (w/v) %の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2～2.0 (w/v) %のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、および0.01～0.2 (w/v) %のMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで構成される；

b) 培養基のpHは4.5～5.5である；

c) 培養温度は28～32℃である。

d) 該培養基中の溶解酸素濃度は0.1～5.0 (w/v) %の空気飽和率であり；そして

e) 該培養基中のレドックス(還元-酸化)電位は-500～-150mVである、を制御することによってキシロース培養基を工程1)で生育された細胞で発酵させ；

1 i i) 細胞生育のキシリトール産生段階中にキシロースとグルコースの混合物を供給し、ここでキシロースとグルコースの重量比は20:1～5:1であり；

1 v) 細胞および他の残留物を該発酵培養基から除去し；そして

v) 上記工程1 v)の該発酵培養基からキシリトールを単離し回収する；

工程からなる、受託番号KCCM-10122を持つ韓国微生物カルチャーセンターに寄託されたカンジダトロピカリスの新規な菌株を用いる、キシリトールの生産量を最大限にするためのフェドバッチ式発酵法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正内容】

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高い生産性および高い収量でキシリトールを製造するために、ブダペスト条約下において1998年2月20日に受託番号KCCM-10122を持つ韓国微生物カルチャーセンター(Korean Culture Center)に寄託されたカンジダトロピカリス(Candida tropicalis)の新規な菌株を用いる発酵法を提供することである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】本発明の目的は、

i) 細胞をYM培養基中28～32℃で8～16時間生育および培養せしめ、ここでYM培養基は0.8～1.2 (w/v) %のグルコース、0.4～0.6 (w/v) %のペプトン、0.3～0.5 (w/v) %のイースト抽出物、および0.2～0.4 (w/v) %の麦芽抽出物を含有し；

1 i) 以下の発酵条件；

a) キシリトールの最大生産量を得るための培養基の組成が5～20 (w/v) %のキシロース、0.2～1.0 (w/v) %のグルコース、0.2～2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.2～2.0 (w/v) %の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2～2.0 (w/v) %のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、および0.01～0.2 (w/v) %のMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで構成される；

b) 培養基のpHは4.5～5.5である；

c) 培養温度は28～32℃である。

d) 該培養基中の溶解酸素濃度は0.1～5.0 (w/v) %の空気飽和率であり；そして

e) 該培養基中のレドックス(還元-酸化)電位は-500～-150mVである、を制御することによってキシロース培養基を工程1)で生育された細胞で発酵させ；

1 i i) 細胞生育のキシリトール産生段階中にキシロースとグルコースの混合物を供給し、ここでキシロースとグルコースの重量比は20:1～5:1であり；

1 v) 細胞および他の残留物を該発酵培養基から除去し；そして

v) 上記工程1 v)の該発酵培養基からキシリトールを単離し回収する；

工程からなる、受託番号KCCM-10122を持つ韓国微生物カルチャーセンター(Korean Culture Center)に寄託されたカンジダトロピカリス(Candida tropicalis)の新規な菌株を用いる、キシリトールの生産量を最大限にするのに最適なフェドバッチ式発酵法を提供することにある。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】削除

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】主培養

該発酵培養基は、5～20 (w/v) %のキシロース、0.2～2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.2～1.0 (w/v) %のグルコース、0.2～2.0 (w/v)



v) %の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2~2.0 (w/v) %の $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、および0.01~0.2 (w/v) %の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で構成される。発酵培養基を含有する発酵器中のフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH 4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600 rpmである。キシリトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス（還元-酸化）電位は-50~-150 mV、好ましくは-80~-120 mVである。フェドバッチ培養は2 Lの初期培養基を用いて実施され、そして最終容量はキシロースとグルコースの混合溶液を1.0 L供給することによって3 Lとする。この混合溶液において、キシロースとグルコースの重量比は2.0:1~5:1である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】削除

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】削除

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】削除

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】削除

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正内容】

【0022】

【実施例】実施例1

カンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) (KCCM-10122) の凍結 (-70℃) 細胞を、28~32℃の温度および220~260 rpmの回転速度で8~16時間、40~60 mlのY M培養基 (0.8~1.2 (w/v) %のグルコース、0.4~0.6 (w/v) %のペプトン、0.3~0.5 (w/v) %のイースト抽出物および0.2~0.4 (w/v) %の麦芽抽出物) を含有する250 mlのフラスコ中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシリトールを生産するための発酵培養基を含有する5 Lの発酵器へと移す。該発酵培養基は、5~15 (w/v) %のキシロース、0.2~1.0 (w/v) %のグルコース、0.2~2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.

2~2.0 (w/v) %の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2~2.0 (w/v) %の $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.01~0.2 (w/v) %の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で構成される。該発酵器中のフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH 4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600 rpmである。キシリトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス（還元-酸化）電位は-50~-150 mV、好ましくは-80~-120 mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。発酵器の容量を900 gのキシロースを含有する2 Lから、700 gのキシロースおよび35 gのグルコースを含有する1 Lの溶液を連続して供給することによって増量する。キシロースの供給は3.0~6.0 %の残留キシロース率において開始される。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】実施例11

カンジダトロピカリス (*Candida tropicalis*) (KCCM-10122) の凍結 (-70℃) 細胞を、28~32℃の温度および220~260 rpmの回転速度で8~16時間、40~60 mlのY M培養基 (0.8~1.2 (w/v) %のグルコース、0.4~0.6 (w/v) %のペプトン、0.3~0.5 (w/v) %のイースト抽出物および0.2~0.4 (w/v) %の麦芽抽出物) を含有する250 mlのフラスコ中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシリトールを生産するための発酵培養基を含有する5 Lの発酵器へと移す。該発酵培養基は、5~15 (w/v) %のキシロース、0.2~1.0 (w/v) %のグルコース、0.2~2.0 (w/v) %のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) %の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.2~2.0 (w/v) %の $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.01~0.2 (w/v) %の $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ で構成される。該発酵器中のフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH 4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600 rpmである。キシリトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス（還元-酸化）電位は-50~-150 mV、好ましくは-80~-120 mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。キシロースのフェドバッチ培養はキシリトールの生産における高キシロース濃度の抑制作用のため実施される。発酵器の容量を900 gのキシロースを含有する2 Lから、700 gのキシロースおよび100 g

のグルコースを含有する1 Lの溶液を連続して供給することによって増量する。キシロースの供給は3.0~6.0%の残留キシロース率において開始される。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】実施例111

カンジダトロピカリス (Candida tropicalis) (KCCM-10122) の凍結 (-70℃) 細胞を、28~32℃の温度および220~260 rpmの回転速度で8~16時間、40~60 mlのY M培養基 (0.8~1.2 (w/v) %のグルコース、0.4~0.6 (w/v) %のペプトン、0.3~0.5 (w/v) %のイースト抽出物および0.2~0.4 (w/v) %の麦芽抽出物) を含有する250 mlのフラスコ中で培養し、そしてこのシード培養を主培養でキシトールを生産するための発酵培養基を含有する5 Lの発酵器へと移す。該初期発酵培養基は、5~15 (w/v) %

\* v) %のキシロース、0.2~1.0 (w/v) %のグルコース、0.2~1.5 (w/v) %のイースト抽出物、0.2~2.0 (w/v) %の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.2~2.0 (w/v) %のKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.01~0.2 (w/v) %のMgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで構成される。該発酵器中でのフェドバッチ培養を28~32℃の温度およびpH 4.5~5.5で実施する。攪拌速度は300~600 rpmである。キシトール生産段階において、該培養基中の溶解酸素濃度は0.1~5.0%の空気飽和率であり、そして該培養基中のレドックス (還元-酸化) 電位は-50~-150 mV、好ましくは-80~-120 mVである。培養はキシロースが完全に消費されるまで実施される。キシロースのフェドバッチ培養はキシトールの生産における高キシロース濃度の抑制作用のため実施される。発酵器の容量を900 gのキシロースを含有する2 Lから、700 gのキシロースおよび140 gのグルコースを含有する1 Lの溶液を連続して供給することによって増量する。キシロースの供給は3.0~6.0%の残留キシロース率において開始される。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>7</sup>

C12R 1:74)

識別記号

F1

7-コード (参考)

(72)発明者 デョク・クン・オー

大韓民国 チョンブク、チョンジュ、デョ  
クジンギ、ソンチョンドン、ピサプ  
ル・アパートメント 16-505

(72)発明者 スー・リョン・ジュン

大韓民国 ソウル、ソンバング、チャムシ  
ルドン 86 アジア・サンサー・チョン・  
アパートメント 1-901

Fターム(参考) 4B064 AC05 CA06 CC04 CC06 CC07  
CC09 CC12 CD09 DA07 DA10  
4B065 AA75X AC14 AC16 BA22  
BB15 CA07 CA41 CA44